

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12N 15/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01806456.6

[43] 公开日 2003 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 1418257A

[22] 申请日 2001.2.23 [21] 申请号 01806456.6

[30] 优先权

[32] 2000.3.14 [33] JP [31] 70284/2000

[86] 国际申请 PCT/JP01/01332 2001.2.23

[87] 国际公布 WO01/68914 日 2001.9.20

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.12

[71] 申请人 大塚制药株式会社

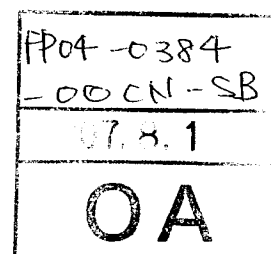
地址 日本东京

[72] 发明人 高市昌久 冈本俊彦 渡边义也

半谷泉

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 5 页 说明书 18 页 序列表 6 页
附图 3 页[54] 发明名称 嗜酸菌的核酸引物及鉴定嗜酸菌的
方法

[57] 摘要

本发明提供了一种简单、快速的检测和鉴定饮料等类似产品中有害嗜酸菌的技术。本方法包括使用包含 SEQ ID NOS: 1 至 14 之一所示核苷酸序列的特异性的核酸引物对, 通过 PCR 扩增, 对样品中嗜酸菌进行检测和鉴定。

ISSN 1000-4274

1. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 1-14 中任一个所示的核苷酸序列。

5

2. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。

3. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

10

4. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列。

5. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 4 所示的核苷酸序列。

6. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列。

15

7. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列。

8. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列。

20

9. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

10. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 9 所示的核苷酸序列。

11. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 10 所示的核苷酸序列。

25

12. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 11 所示的核苷酸序列。

13. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 12 所示的核苷酸序列。

30

14. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 13 所示的核苷酸序列。

15. 一种核酸引物，其包含由 SEQ ID NO: 14 所示的核苷酸序列。

16. 一种用于鉴定嗜酸菌的引物对，其是下面任意一个引物对：

5 (1) 包含由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ
ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；(2) 包含由 SEQ ID
NO: 3 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷
酸序列的核酸引物的引物对；(3) 包含由 SEQ ID NO: 4 所示核苷酸
10 序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的核酸引物
的引物对；(4) 包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和
包含由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；(5) 包
含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO:
8 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；(6) 包含由 SEQ ID NO: 9
15 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 10 所示核苷酸序列
的核酸引物的引物对；(7) 包含由 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列
的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的核酸引物的引
物对；(8) 包含由 SEQ ID NO: 13 所示核苷酸序列的核酸引物和包
含由 SEQ ID NO: 14 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

20 17. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 1 所示
核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核
酸引物的引物对。

25 18. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 3 所示
核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核
酸引物的引物对。

30 19. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 4 所示
核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的核
酸引物的引物对。

20. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

5

21. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 8 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

10

22. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 9 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 10 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

15

23. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

20

24. 根据权利要求 16 的引物对，其是包含由 SEQ ID NO: 13 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 14 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

25

25. 鉴定样品中至少一种嗜酸菌的方法，包括采用选自下组中的至少一个引物对进行 PCR：（1）包含由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（2）包含由 SEQ ID NO: 3 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（3）包含由 SEQ ID NO: 4 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（4）包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（5）包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的

30

核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 8 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（6）包含由 SEQ ID NO: 9 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 10 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（7）包含由 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（8）包含由 SEQ ID NO: 13 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 14 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

26. 根据权利要求 25 的方法，其中嗜酸菌为酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*），所述引物对是选自下组中的至少一种：（1）包含由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（2）包含由 SEQ ID NO: 3 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；和（6）包含由 SEQ ID NO: 9 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 10 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

27. 根据权利要求 25 的方法，其中嗜酸菌为酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*），所述引物对是选自下组中的至少一种：（3）包含由 SEQ ID NO: 4 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；和（7）包含由 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

28. 根据权利要求 25 的方法，其中嗜酸菌为环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*），所述引物对是选自下组中的至少一种：（4）包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（5）包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 8 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；和（8）包含由 SEQ ID NO:

13 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 14 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

29. 根据权利要求 25 的方法，其中嗜酸菌为选自酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）、酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*）、环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）中的至少一种，所述引物对是选自组 1 的至少一个成员、选自组 2 的至少一个成员和选自组 3 的至少一个成员：

组 1：（1）包含由 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（2）包含由 SEQ ID NO: 3 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 2 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；和（6）包含由 SEQ ID NO: 9 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 10 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；

组 2：（3）包含由 SEQ ID NO: 4 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 5 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；和（7）包含由 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；

组 3：（4）包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 7 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；（5）包含由 SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 8 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对；和（8）包含由 SEQ ID NO: 13 所示核苷酸序列的核酸引物和包含由 SEQ ID NO: 14 所示核苷酸序列的核酸引物的引物对。

30. 根据权利要求 25 的方法，其中所述样品为饮料。

嗜酸菌的核酸引物及鉴定嗜酸菌的方法

5 技术领域

本发明涉及具有对嗜酸菌特别是属于脂环酸芽孢杆菌属（*Alicyclobacillus*）的嗜酸菌特异的序列的核酸引物以及用此引物鉴定嗜酸菌的方法。

10 背景技术

多数细菌很难在酸性饮料（如果汁，乳酸菌饮料）中生长，因而这种饮料不容易被难以在其中生长的这些细菌污染。但是，能够在酸性环境中生长的嗜酸菌可以引起酸性饮料污染，尤其是耐高温的嗜酸菌的污染，这些细菌用传统的高温消毒方法难以将其杀灭。

15

有几种方法可以检验在这些饮料中存在嗜酸菌引起的污染，某些培养基可用于这种检测方法。如日本未经审查的公开号 1996-140697 公开了检测耐高温嗜酸菌的选择性培养基和检测该菌的方法。日本未经审查的公开号 1996-140696 提出了检测可在果汁中生长的一种耐热嗜酸菌的方法。

20

在这些方法中，细菌可通过生化特性实验得到检测，如分析细菌体的脂肪酸成分。该特性实验的缺点在于需要大量时间与人力。并且，所检验细胞的鉴定要经过全面的生物学检测，这也需要大量的时间和复杂的步骤。

25

最近提出一种方法可以取代以上方法，该方法用嗜酸菌基因的部分核苷酸序列作为引物，通过 PCR 进行 DNA 分析，能够快速、方便地检测出饮料样品中是否存在嗜酸菌（日本未经审查的专利公开号 1998-234376）。

30

该方法所用的引物有编码一种酶的部分核酸序列，这种酶存在于耐高温的嗜酸菌中，并与 ω -环己烷脂肪酸的生物合成有关。使用这种引物的方法只能检测能产生这种参与 ω -环己烷脂肪酸的生物合成的细菌。也就是说，该方法不能检测嗜酸菌，而是检测能够产生一种特定酶的细菌，不管该菌是否有嗜酸性。然而，嗜酸菌与能否产生该特定酶没有直接关系。因此，也许能污染饮料或其类似物的嗜酸菌不一定都能产生这种特定的酶。多数引起污染的嗜酸菌没有产生这种特定的酶的能力。因此，用上述检测方法所得的结果不可能预测由污染，引起的食物或饮料问题如难闻气味。

所以，上述方法不适于检测饮料或类似样品中含有的或有可能污染样品的嗜酸菌。该方法不能确定饮料样品安全与否（样品是否被有害的嗜酸菌污染）。另外，这种方法不能确认嗜酸菌的种类。

本发明的目的在于提供一种可选择性检测和鉴定嗜酸菌的方法。

发明公开

本发明者为达到上述目的进行了广泛深入的研究。最后，发明者成功地合成了针对有害嗜酸菌基因的特异性核苷酸序列的引物，该嗜酸菌可能存在于饮料或类似样品中，并且开发了用该引物通过 PCR 迅速、方便地检测和鉴定样品中有害嗜酸菌的方法。至此，发明者完成了本发明。

本发明提供的核酸引物，每一个都含有一段核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 1-14 中任一个所示。

本发明还提供用于鉴定嗜酸菌的如下从（1）到（8）的引物对。

（1） 此对引物由两个引物组成，其分别含有如 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

(2) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

(3) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列。

5 (4) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 7 所示的核苷酸序列。

(5) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

10 (6) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的核苷酸序列。

(7) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 12 所示的核苷酸序列。

(8) 此对引物由两个引物组成, 其分别含有如 SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的核苷酸序列。

15

本发明还提供了鉴定方法, 该方法通过使用以上 (1) - (8) 中的至少一对引物, 通过 PCR 扩增, 鉴定至少一种嗜酸菌, 具体地讲, 鉴定存在于样品, 特别是饮料中选自以下一组嗜酸菌中的至少一种: 酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*), 酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 和环庚基脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*)。本发明中嗜酸菌的鉴定方法包括如下 (a) 至 (c) 的实施方案。

20

(a) 使用 (1)、(2) 和 (6) 引物对中的至少一对鉴定酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*)。

25

(b) 使用 (3) 和 (7) 引物对中的至少一对鉴定酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)。

(c) 使用 (4)、(5) 和 (8) 引物对中的至少一对鉴定环庚基脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*)。

30

具体地讲, 本发明提供了一种通过一次 PCR 反应完成 (a) 到 (c)

所述实施方案的方法。该方法可以实现，因为在相同 PCR 条件下本发明的引物对能够扩增三种嗜酸菌的每一种菌的靶基因区。在该方法中，对三种嗜酸菌特异的三个引物对都放在例如多孔板的孔中，随后对样品进行 PCR，以便使三种嗜酸菌能够同时由一次 PCR 反应检测和鉴定出来。如此，这种方法能简便、迅速地检查样品中存在的有害嗜酸菌，并因此能简单、快速地预测样品中的污染。

本发明的鉴定方法测试样品中存在的细菌 DNA 是否与本发明的核酸引物杂交，以确定嗜酸菌（脂环酸芽孢杆菌属（*Alicyclobacillus*）的特定微生物）的存在与否。

在本说明书中，氨基酸、肽、核苷酸序列、核酸等的缩写参见 IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138:9 (1984) 或 “Guideline for preparation of a specification containing nucleotide sequences or amino acid sequences (JPO)” 或在该领域中常规使用的那些缩写。

以下将详细阐述根据本发明的核酸引物、引物对和嗜酸菌的鉴定方法。

本发明的核酸引物必需包含一个由 SEQ ID NOS: 1-14 所示的核苷酸序列。每一序列 ID 号所表示的核苷酸序列基本与嗜酸菌的 16s 的核糖体 RNA 的部分核苷酸序列相对应。

本发明者注意到了嗜酸菌 16s 的核糖体 RNA 基因，并发现使用具有该菌 16s 核糖体 RNA 基因特定部位的核苷酸序列或其同源核苷酸序列即在严格条件下能与 16s 核糖体 RNA 基因的核苷酸序列杂交的核苷酸序列作为引物能够特异地鉴定靶嗜酸菌。

16s 的核糖体 RNA 基因编码核糖体 RNA，核糖体 RNA 是核糖体

（合成蛋白质的一种重要的细胞器）的结构成分，该基因存在于所有的微生物中。

可能混在饮料中的属于脂环酸芽孢杆菌属的有害嗜酸菌的 16s 核糖体 RNA 基因是已知的。如，关于酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）（ATCC27009），源于 DSM446 菌株的 1548 个碱基对（在 EMBL/GenBank 数据库中注册，登录号为 X60742）就是已知的[*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42 (2), 263-269 (1992)]。关于酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*），被保藏微生物 ATCC49025 的 16s 核糖体 RNA (1522 bp) 可参见 Hokkaido 大学助研 Yamazaki 的博士论文。关于环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）（ATCC49028），已知 1537 个碱基对在 EMBL/GenBank 数据库中注册，登录号为 X51928 [*Curr. Microbiol.*, 21, 325-327 (1990)]。

由于 16s 核糖体 RNA 是种特定的，该 RNA 的特定部分序列能够非常好地用于鉴定可能存在于饮料等样品中的有害嗜酸菌。

本发明的核酸引物被设计成：被扩增的区域有大约 100 到 2000 bp 长，引物长至少约 10 个核苷酸，优选 13 到 30 个核苷酸，更优选 13 到 23 个核苷酸。

最好是引物对中的两个引物具有尽可能近的 T_m 值（Nakayama, Hiroki, “Shinpan Bio Jikken Illustrated: Honto ni fueru PCR (New Edition of Illustrated Biological Experiment: Efficient PCR)”, Shujun-sha, page 25 (2nd ed., June 1, 1998), 以提高扩增的再现性。引物的核苷酸序列优选尽可能与基因的核苷酸序列相似，以提高与待扩增基因区域的特异结合能力。但引物核苷酸序列不必完全与基因核苷酸序列相同。有一或几个碱基不同于基因的碱基的引物能扩增到所需的基因核苷酸序列，从而检测特定的嗜酸菌。这种引物的实例包括那些含有由 SEQ ID

NO: 3 或 8 所示核苷酸序列的引物。

就以上条件，本发明的引物用已知的方法即可合成。如可用化学方法亚磷酸胺法或三酯法合成引物。另外，使用商品化的自动寡核苷酸合成仪，例如 Perkin-Elmer 或其他厂家的自动 DNA 合成仪，通过
5 β -氰乙基合成方法也可合成该引物。

使用化学合成的单链产物，用以下方法能获得双链片段。首先，合成单链产物的互补链，然后，在适宜条件下，使互补链与单链产物退火/复性或用合适的引物序列和 DNA 聚合酶使之加到单链产物中。
10

本发明的引物可以被定义为在严格条件下，能够与含有特定嗜酸菌 16s 核糖体 RNA 的核苷酸序列的 DNA 进行杂交的一段 DNA。严格条件是指通常使用引物的条件。如这样一种条件：在 50℃下，含
15 0.1%SDS 的 0.2×SSC，或 60℃下，在含 0.1%SDS 的 1×SSC 中。

本发明中引物核苷酸序列的具体实例如 SEQ ID NOS: 1-14 所示。SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列与酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) DSM446 16s 核糖体 RNA 基因 (登录号 X60742, 1548
20 bp) 的核苷酸序列的 161-180 位核苷酸相对应。SEQ ID NO: 3 序列与以上序列相同，只是第 3 个碱基 A 被 G 替代。

SEQ ID NO: 2 的核苷酸序列与酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) DSM446 16s 核糖体 RNA 基因 (登录号 X60742, 1548 bp) 的互补链序列的核苷酸序列的 591-611 位核苷酸相对应。
25

SEQ ID NO: 4 的核苷酸序列与酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) ATCC49025 的 16s 核糖体 RNA 基因 (1522bp) 的核苷酸序列 172-192 位相对应。
30

SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列与酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) ATCC49025 的 16s 核糖体 RNA 基因核 (1522bp) 的核苷酸序列 587-609 位相对应。

5

SEQ ID NO: 6 的核苷酸序列与环庚基脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) 16s 核糖体 RNA 基因 (登录号 X51928, 1537bp) 的核苷酸序列的 186-207 位相对应。

10

SEQ ID NO: 7 的核苷酸序列与环庚基脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) 16s 核糖体 RNA 基因 (登录号 X51928, 1537bp) 的核苷酸序列的 583-603 位相对应。

15

SEQ ID NO: 8 与 SEQ ID NO: 7 相同, 除了第 11-14 位碱基的 cccg 被 ttc 所取代。

20

SEQ ID NO: 9 的核苷酸序列与酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) 16s 核糖体 RNA 基因 (登录号 X60742, 1548bp) 的核苷酸序列的 168-180 位相对应。

25

SEQ ID NO: 10 的核苷酸序列与酸热脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidocaldarius*) 16s 核糖体 RNA 基因 (登录号 X60742, 1548bp) 的互补链序列的核苷酸 591-605 位相对应。

30

SEQ ID NO: 11 的核苷酸序列与酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) ATCC49025 的 16s 核糖体 RNA 基因 (1522bp) 的核苷酸序列的 176-192 位相对应。

SEQ ID NO: 12 的核苷酸序列与酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) ATCC49025 的 16s 核糖体 RNA 基

因（1522bp）的核苷酸序列的 587-606 位相对应。

5 SEQ ID NO: 13 的核苷酸序列与环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）16s 核糖体 RNA 基因（登录号 X51928, 1537bp）的核苷酸序列的 191-207 位相对应。

10 SEQ ID NO: 14 的核苷酸序列与环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）16s 核糖体 RNA 基因（登录号 X51928, 1537bp）的核苷酸序列的 583-595 位相对应。

可用于本发明方法中的引物组合（正向引物和反向引物组成的引物对）实例包括以上（1）到（8）个引物对。

15 使用本发明中的引物对，通过确认样品中是否有扩增的 DNA 片段，可以检测和鉴定嗜酸菌（酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*），酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*），环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*））。

20 本发明方法中使用的典型样品的实例为饮料，其他样品包括土壤、蔬菜、肉类和糖果等，最好通过钩取菌落法将在合适的培养基中培养的克隆钓出，把测试细菌从样品中分离出来。

25 依照本发明的方法，首先通过已知方法如酚抽提等从按上述方式分离的测试菌中提取 DNA 以获得 DNA 样本，然后使本发明的某对引物和 DNA 聚合酶作用于所得 DNA 样本的一部分，在特定条件下进行 PCR 反应。PCR 可以扩增样品 DNA 的特定基因区域。所获 PCR 混合物经过例如电泳，根据大小分离扩增的 DNA，最后确定是否存在 DNA 扩增产物。

30

以这种方式，本发明方法通过核查是否含有预期大小的 DNA 扩增产物能够判断样品中是否含有嗜酸菌。而且 DNA 扩增产物的核苷酸序列可以被测定，并通过与特定嗜酸菌基因区域的核苷酸序列进行比较，能进行更可靠的检测和鉴定。

5

PCR 反应可以通过传统方法进行（例如，见 Science,230,1350(1985)）。

10

被扩增的 DNA 片段可以通过传统方法如凝胶电泳进行分离和纯化。

15

本发明引物及被分离和纯化 DNA 片段的核苷酸序列可以通过传统方法测定，如双脱氧法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA.,74,5463(1977)]、Maxam-Gilbert 法[Methods in Enzymology, 65,499(1980)]或类似方法。商品化的序列测定试剂盒可更方便地测定核苷酸的序列。

20

本发明的引物可用做 DNA 杂交方法的探针，用来鉴定嗜酸菌。DNA 杂交方法例如可按如下进行：将按上述方法从样品制备的 DNA 样本吸附并固定到聚酰胺膜或类似物上，与标有生物素或类似物的探针杂交。依该方法，如果 DNA 样本与探针互补，就会在聚酰胺膜（或类似物）上形成双链。通过测量双链中标记物的活性可以鉴定待测嗜酸菌。

附图的简要说明

25

图 1 是使用本发明的引物对，对嗜酸菌鉴定时所得 PCR 产物的电泳结果图。

图 2 是使用本发明的引物对，对嗜酸菌鉴定时所得 PCR 产物的电泳结果图。

30

图 3 是使用本发明的引物对，对嗜酸菌鉴定时所得 PCR 产物的电泳结果图。

完成本发明的最好方式

举出下面的实施例，对本发明进行更详尽说明。

5 实施例 1

(1) 测试细菌

下面表 1 中所列的被保藏的细菌用作测试菌。

表 1

| 种类 | 菌株 |
|--|------------------|
| 酸热脂环酸芽孢杆菌 (<i>A. acidocaldarius</i>) | IFO15652 (菌株类型) |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌 (<i>A. acidoterrestris</i>) | ATCC49025 (菌株类型) |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌 (<i>A. cycloheptanicus</i>) | IFO15310 (菌株类型) |
| 芽孢杆菌属模式种 (<i>B. subtilis</i>) | ATCC6633 |
| 凝结芽孢杆菌 (<i>B. coagulans</i>) | IAM1115 (菌株类型) |
| 嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>B. stearothermophilus</i>) | IAM1035 |
| 生孢梭菌 (<i>C1. Sporogenes</i>) | IAM19235 |

10

(2) DNA 溶液制备

使用 InstaGene DNA 纯化介质 (Bio-Rad)，按公司说明书操作，从每个测试菌中制备 DNA 溶液。具体过程是，对菌体进行漂洗，包括用 800 μ l 无菌水悬浮接种环细胞，离心悬浮液 (10000G, 10 分钟)，去上清，分离沉淀物 (细胞)。重复一次此漂洗过程。把 InstaGene DNA 纯化介质 (200 μ l) 加到所获的沉淀物 (细胞) 中，随后在 56 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。然后，细胞经搅拌 (使用旋涡器) 和煮沸 (8 分钟) 溶解，最后获取 DNA 溶液。

15

20

(3) 本发明引物的设计与合成

表 2 所示的本发明引物是根据如下三种嗜酸菌的 16s 核糖体 RNA

基因的核苷酸序列设计和合成的：酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）的 16s 核糖体 RNA 基因（登录号 X60742，（EMBL/GenBank 数据库））[*Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**（2），263-269 (1992)]，酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*）的 16s 核糖体 RNA 基因（参见 Hokkaido 大学助研 Yamazaki 的博士论文），和环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）的 16s 核糖体 RNA 基因(登录号为 X51928(EMBL/GenBank 数据库))[*Curr. Microbiol.*, **21**, 325-327 (1990)]。用自动 DNA 合成仪（Perkin-Elmer）进行引物合成。

表 2

| 种类 | 引物 | 核苷酸序列 | Tm（℃） |
|---|------|--------------|-------|
| 酸热脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. Acidocaldarius</i> ） | 正向引物 | SEQ ID NO: 1 | 61.6 |
| 酸热脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. Acidocaldarius</i> ） | 反向引物 | SEQ ID NO: 2 | 57.6 |
| 酸热脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. Acidocaldarius</i> ） | 正向引物 | SEQ ID NO: 3 | 63.6 |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. acidoterrestris</i> ） | 正向引物 | SEQ ID NO: 4 | 57.6 |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. acidoterrestris</i> ） | 反向引物 | SEQ ID NO: 5 | 54.2 |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. cycloheptanicus</i> ） | 正向引物 | SEQ ID NO: 6 | 59.5 |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. cycloheptanicus</i> ） | 反向引物 | SEQ ID NO: 7 | 63.3 |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌（ <i>A. cycloheptanicus</i> ） | 反向引物 | SEQ ID NO: 8 | 57.6 |

（4）通过 PCR 鉴定嗜酸菌

（4-1）PCR 混合物的制备

根据表 3 所示配方，在 0.2ml 试管（TAKARA SHUZO 公司）中加入试剂和由（2）制备的各 DNA 溶液，制成 PCR 混合物。本操作须在冰块上进行。

表 3

| 成分 | 量 ($\mu\text{l}/25\mu\text{l}$) | 终浓度 |
|--|--------------------------------------|------------------------|
| 5U/ μl TaKaRa Taq | 0.25 | 1.25U/25 μl |
| 10 \times PCR 缓冲液 (无 MgCl_2) | 2.5 | 1 倍浓度 |
| 25mM MgCl_2 | 2 | 2 mM |
| 2.5 mM dNTP 混合物 | 2 | 200 μM |
| 4pmol/ μl 正向引物 | 2 | 320 nM |
| 4pmol/ μl 反向引物 | 2 | 320 nM |
| DNA 模板 | 1 | — |
| 灭菌蒸馏水 | 13.25 | — |
| 总计 | 25 | — |

(4-2) PCR

5 把含有由 (4-1) 制备的混合物的每个试管放入热循环仪中进行
热激 (TakaRa PCR 热循环仪 MP, TAKARA SHUZO 公司产品), 然
后, 在如表 4 所示的温度条件下进行 PCR。具体步骤是, 在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下进
行 4 分钟的热变性后, 完成如下的循环 29 次: 94 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 30 秒, 60
10 $^{\circ}\text{C}$ 退火/复性 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长反应 1 分钟。最后, 在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下经 30 秒
热变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 秒退火/复性, 72 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 分钟的延长反应完成 PCR。

表 4

| 步骤 | 温度 ($^{\circ}\text{C}$) | 循环 1 | 循环 2 | 循环 3 |
|------|---------------------------|------|------|------|
| | | 时间 | 时间 | 时间 |
| 热变性 | 94 | 4 分钟 | 30 秒 | 30 秒 |
| 退火 | 60 | — | 30 秒 | 30 秒 |
| 延长反应 | 72 | — | 1 分钟 | 5 分钟 |
| 循环数 | | 1 | 29 | 1 |

15 实验使用的引物对为: (A) 由引物 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2
组成; (B) 由引物 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:2 组成; (C) 由引
物 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 组成; (D) 由引物 SEQ ID NO:6 和

SEQ ID NO:7 组成；（E）由引物 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:8 组成。
第一个实验使用引物对（A）、（C）和（D），第二个实验使用引物对（B）、（C）和（E）完成。

5

(4-3) 电泳

完成 PCR 扩增后，在 25μl 的反应混合物中加入 5μl 6×上样缓冲液（TAKARA SHUZO CO.,LTD）,混匀后取 6μl 所得混合物在 1.5%琼脂糖凝胶（琼脂糖 LO3，TAKARA SHUZO CO.,LTD.的产品,1 ×TBE 缓冲液）上进行电泳(电泳设备：Mupid, Cosmo Bio Co.)

10

(4-4) 观察

完成电泳之后，将凝胶在含 1μg/ml 溴乙锭的溶液中染色 20 分钟，然后用水浸洗 10 分钟。在紫外线（微型透照器，Bio-Rad）下观察电泳图并用 Polaroid 相机进行拍照。

15

(4-5) 结果

图 1 和 2 为该电泳结果（照片）。

20

图 1 为第一个实验的结果（使用引物对（A），（C），（D））。
图 2 为第二个实验的结果（使用引物对（B），（C），（E））。图 1 和 2 的各泳道的具体说明如下。

图 1:

| 泳道 | M | 标准分子量 |
|----|------|---------------------------------|
| 25 | 泳道 1 | 酸热脂环酸芽孢杆菌（A. Acidocaldarius） |
| | 泳道 2 | 酸土脂环酸芽孢杆菌（A. Acidoterrestris） |
| | 泳道 3 | 环庚基脂环酸芽孢杆菌（A. Cycloheptanicus） |
| | 泳道 4 | 芽孢杆菌属模式种（B. subtilis） |
| | 泳道 5 | 凝结芽孢杆菌（B. coagulans） |
| 30 | 泳道 6 | 嗜热脂肪芽孢杆菌（B. stearothermophilus） |

泳道 7 生孢梭菌 (C1. Sporogenes)

图 2:

泳道 M 标准分子量

5 泳道 1 环庚基脂环酸芽孢杆菌 (A. Cycloheptanicus)

泳道 2 酸土脂环酸芽孢杆菌 (A. Acidoterrestris)

泳道 3 酸热脂环酸芽孢杆菌 (A. Acidocaldarius)

泳道 4 芽孢杆菌属模式种 (B. subtilis)

泳道 5 凝结芽孢杆菌 (B. coagulans)

10 泳道 6 嗜热脂肪芽孢杆菌 (B. stearothermophilus)

泳道 7 生孢梭菌 (C1. Sporogenes)

根据照片所示结果，可以分析各引物对和各测试菌之间的关系(+: 检测到的；-: 未检测到的)。表 5 为实验结果。

15

表 5

| 细菌种类 | 引物对 | | | | | |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | (A) | (C) | (D) | (B) | (C) | (E) |
| 酸热脂环酸芽孢杆菌 (A. Acidocaldarius) | + | - | - | + | - | - |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌 (A. Acidoterrestris) | - | + | - | - | + | - |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌 (A. Cycloheptanicus) | - | - | + | - | - | + |
| 芽孢杆菌属模式种 (B. subtilis) | - | - | - | - | - | - |
| 凝结芽孢杆菌 (B. coagulans) | - | - | - | - | - | - |
| 嗜热脂肪芽孢杆菌 (B. stearothermophilus) | - | - | - | - | - | - |
| 生孢梭菌 (C1. Sporogenes) | - | - | - | - | - | - |

以上图 1、图 2 和表 5 所示结果表明：当测试菌为以下三种菌，

酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*），酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*），环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）时，通过使用本发明的引物对可分别形成 450 bp，430 bp 和 400 bp 的 PCR 靶产物。另外可以确定，当测试菌为其他类似种类时没有 PCR 产物形成。

这说明使用本发明的一种引物对便能可靠地检测和鉴定这三种嗜酸菌中的任意一种。

以上测试是在相同 PCR 条件下进行的。因此，当以上三种分别针对三种嗜酸菌的引物对结合使用时，通过一次 PCR 即可同时检测和鉴定以上三种嗜酸菌。由此，本方法能简单、快速、特异性地检测出可能存在于样品中的有害嗜酸菌。从而判断出样品是否被嗜酸菌污染。

实施例 2

（1）测试菌

表 1 所列的被保藏细菌用作测试菌。

（2）DNA 溶液制备

按实施例 1（2）中同样的方式制备 DNA 溶液。

（3）本发明引物的设计与合成

表 6 所列引物的设计与合成分别根据以下三种嗜酸菌的 16s 核糖体 RNA 基因核苷酸序列：酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）的 16s 核糖体 RNA 基因（登录号 X60742，（EMBL/GenBank 数据库））[Int. J. Syst. Bacteriol., 42（2），263-269（1992）]，酸土脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidoterrestris*）的 16s 核糖体 RNA 基因（参见 Hokkaido 大学助研 Yamazaki 的博士论文），和环庚基脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus cycloheptanicus*）的 16s 核

糖体 RNA 基因（登录号为 X51928（EMBL/GenBank 数据库））[Curr. Microbiol., 21, 325-327 (1990)]。用自动 DNA 合成仪（Perkin-Elmer）合成引物。

5

表 6

| 种类 | 引物 | 核苷酸序列 | Tm (°C) |
|------------------------------------|------|----------------|---------|
| 酸热脂环酸芽孢杆菌 (A. Acidocaldarius) | 正向引物 | SEQ ID NOS: 9 | 53.0 |
| 酸热脂环酸芽孢杆菌 (A. Acidocaldarius) | 反向引物 | SEQ ID NOS: 10 | 51.2 |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌 (A. acidoterrestris) | 正向引物 | SEQ ID NOS: 11 | 49.8 |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌 (A. acidoterrestris) | 反向引物 | SEQ ID NOS: 12 | 49.3 |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌 (A. cycloheptanicus) | 正向引物 | SEQ ID NOS: 13 | 49.8 |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌 (A. cycloheptanicus) | 反向引物 | SEQ ID NOS: 14 | 53.0 |

（1）通过 PCR 鉴定嗜酸菌

（4-1）PCR 混合物制备

10 根据表 3 配方，把试剂和在（2）中制备的 DNA 溶液放入 0.2 ml 试管（TAKARA SHUZO 公司）中制成 PCR 混合物。以上操作于冰块上进行。

（4-2）PCR

15 把装有如上（4-1）混合物的试管放到热循环仪（TaKaRa PCR 热循环仪 MP, TAKARA SHUZO CO., LTD.产品）中进行热激。然后在表 4 所列的温度条件下进行 PCR。

20 使用的引物对为：（F）由引物 SEQ ID NO: 9 和引物 SEQ ID NO: 10 组成；（G）由引物 SEQ ID NO: 11 和引物 SEQ ID NO: 12 组成；（H）由引物 SEQ ID NO: 13 和引物 SEQ ID NO: 14 组成。

(4-3) 电泳观察

5 完成 PCR 扩增后，在 25 μ l 的反应混合物中加入 5 μ l 6 \times 上样缓冲液（TAKARA SHUZO CO.,LTD），混匀后取 6 μ l 在 1.5%琼脂糖凝胶（琼脂糖 LO3, TAKARA SHUZO CO.,LTD.产品, 1 \times TBE 缓冲液）上进行电泳(电泳设备：Mupid, Cosmo Bio Co.)

10 电泳之后，将凝胶在含 1 μ g/ml 溴乙锭的溶液中染色 20 分钟，然后用水浸洗 10 分钟。在紫外线（微型透照器，Bio-Rad）下观察凝胶迁移图并用 Polaroid 相机拍照。

(1) 结果

图 3 所示为该电泳结果（照片）。

15 在图 3 中，从左到右所示为使用引物对（F），（G）和（H）的结果。各泳道的含义同图 1.。

20 根据照片所示结果，可分析使用每对引物对和检测每种测试菌间的关系（+：检测到；—：未检测到）。表 7 示该结果。

表 7

| 细菌种类 | 引物对 | | |
|--|-----|-----|-----|
| | (F) | (G) | (H) |
| 酸热脂环酸芽孢杆菌 (<i>A. Acidocaldarius</i>) | + | — | — |
| 酸土脂环酸芽孢杆菌 (<i>A. Acidoterrestris</i>) | — | + | — |
| 环庚基脂环酸芽孢杆菌 (<i>A. Cycloheptanicus</i>) | — | — | + |
| 芽孢杆菌属模式种 (<i>B. subtilis</i>) | — | — | — |
| 凝结芽孢杆菌 (<i>B. coagulans</i>) | — | — | — |
| 嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>B. stearothermophilus</i>) | — | — | — |
| 生孢梭菌 (<i>C1. Sporogenes</i>) | — | — | — |

图 3 和表 7 的结果表明：当测试菌为以下三种，也就是酸热脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)、环庚基脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus cycloheptanicus*) 时，使用本发明的引物对可以分别扩增出 450bp、430bp 和 400bp 的 PCR 靶产物。另一方面还证实，若测试菌为其它类似菌，则不会有 PCR 产物出现。这表明使用本发明的引物对能对以上三种嗜酸菌进行可靠的检测和鉴定。

在可能被嗜酸菌污染的饮料等样品中，使用一次 PCR 反应进行上述检测，就可同时对以上三种嗜酸菌进行检测和鉴定。例如，将对三种嗜酸菌之一特异的本发明的引物对分别加入多孔板的孔中，对样品进行 PCR 扩增。因此本发明能够简单、快速地检测出样品中嗜酸菌的污染。

工业实用性

本发明提供嗜酸菌特异性的引物。使用本发明的这些引物，能够对饮料等类似产品中嗜酸菌的污染进行特异、简单、快速检测。